

## 明 細 書

## 組織再生用基材および細胞との複合体とその製造方法

## 5 技術分野

本発明は高分子化合物とリン脂質を主たる成分とするハニカム構造を有するフィルムからなる組織再生用基材、それと細胞との複合体、およびその製造方法に関する。

## 10 従来の技術

材料表面のマイクロパターンや立体構造が、細胞活性をコントロールできることは、多くの注目を集めており、最近多くの報告がなされている再生医療分野においても注目される技術である。細胞にとって最適な大きさ、表面構造、空間の創造など微細構造を作成する技術開発が、生体組織の自由な設計において重要な役割を握っている。

たとえば、軟骨組織は血管、神経、リンパ管が存在しない組織であるため、再生能力が乏しい。したがって一度損傷を受けた部位は再生せず、本来の機能を失ってしまう。臨床的に関節軟骨が欠損する疾患としては、変形性関節症、関節リウマチなどの疾患や、外傷による関節軟骨損傷が知られている。このように再生に乏しい軟骨の修復としては、人工関節置換手術が行われているが、人工関節は金属や高分子ポリマーを使用しているため、磨耗、緩み、感染などといった問題を有している。また、その他の方法としては、軟骨細胞移植が行われているが、軟骨は一度損傷を受けると再生しても繊維軟骨となり、もともとあった硝子軟骨に比べると生化学的にも力学的にも十分でない。そのため、近年再生医療として、細胞の性質を支持するために3次元構造を持つ足場を利用した軟骨細胞移植が盛んに研究されている。

このような方法としては、特開2001-293081号公報に軟骨細胞をコーゲンゲル中に包埋した軟骨移植用材料が開示されている。しかしながら、

ラーゲンは低温にて操作しないとゲル化し細胞と混合することができない、ゲル強度が弱いなどといった問題がある。

また、米国特許第 6 1 9 7 0 6 1 号明細書には軟骨細胞をアルジネート中で増殖させる方法について開示されている。しかしながら、アルジネートは細胞増殖  
5 時に使用したのち、分解され、実際には取り出した軟骨細胞を患部へ注入するため、足場としての機能は持っていない。

また、特開 2 0 0 1 - 1 5 7 5 7 4 号公報には、生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーからなるハニカム構造フィルムの細胞培養基材について開示されているが、リン脂質からなるハニカム構造を有する生分解性フィルムの細胞培養基材お  
10 よび軟骨細胞に関する記載はない。

さらに特開 2 0 0 2 - 3 3 5 9 4 9 号公報には、生体分解性ポリマーと両親媒性ポリマーとからなるハニカム構造フィルムの細胞培養基材を用いて、肝臓組織や心筋細胞の三次元集合体を形成する方法が記載されているが、この方法は細胞培養基材の両面に細胞を増殖させて多層構造を形成させるものであり、細胞自身  
15 が三次元的に増殖しているものではない。

### 発明の開示

本発明の目的は、組織再生用基材を提供することにある。本発明の他の目的は、組織再生用基材と細胞との複合体を提供することにある。

20 本発明のさらに他の目的は、組織再生用基材と細胞との複合体の製造方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的および利点は、以下の説明から明らかとなろう。

本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、第 1 に高分子化合物とリン脂質を主たる成分とするハニカム構造を有するフィルムからなる組織再生用基材  
25 によって達成される。

また、本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、第 2 に、高分子化合物とリン脂質を主たる成分とするハニカム構造を有するフィルムからなる組織再生用基材と細胞との複合体によって達成される。

本発明の組織再生用基材は、とりわけ軟骨組織の再生に適した基材である。本発明の生体適合性に優れたハニカム構造を有するフィルムを利用することによって、フィルム自体は二次元構造であっても三次元構造の足場と同様に軟骨組織再生用基材となること、さらに該組織再生用基材上に軟骨細胞を培養することで三次元的に軟骨組織が増殖した細胞と組織再生基材の複合体が得られる。

また、軟骨以外の細胞においても、本発明で開示したハニカムフィルムの上で培養した細胞は、3次的に組織を形成するのに有効である。

さらに、本発明の組織再生用基材は、軟骨以外の他の細胞においても好適な細胞増殖のための場を提供することができる。一例をあげると、従来報告されてきたハニカム構造を有するフィルムよりも、本発明で開示している高分子化合物とリン脂質よりなるハニカムフィルムは、その上で増殖した細胞の代謝活性に優れた好適な場を提供することができる。

本発明の組織再生用基材は表面がハニカム構造になっているため、平滑なフィルムに比べて細胞接着面が少なく、細胞は増殖を抑制し、基質を産出し、三次元構造の足場と同様の効果を現す。組織再生基材そのものは二次元構造をとるため、細胞の播種が容易であるなど取り扱いやすく、保持される細胞の密度が高まり、細胞の培養を容易に、かつ効率的に行うことができる。

#### 図面の簡単な説明

図1 本発明の軟骨再生用基材と該基材上に培養された軟骨細胞との複合体の積層体の模式図である。

図2 本発明の軟骨再生用基材と該基材上に培養された軟骨細胞との複合体の形状の一例である。

図3 実施例1で得られたハニカム構造を有するフィルムの電子顕微鏡写真である。

図4 実施例2および比較例2の代謝活性測定結果である。

図5 比較例1で得られたハニカム構造を有するフィルムの電子顕微鏡写真である。

図6 実施例3で得られた軟骨細胞と軟骨組織再生用基材との複合体の光学顕微鏡写真である。

図7 比較例7で得られた軟骨細胞と軟骨組織再生用基材との複合体の光学顕微鏡写真である。

5

#### 発明の好ましい実施態様

以下、本発明について詳述する。なお、これらの実施例等および説明は本発明を例示するものであり、本発明の範囲を制限するものではない。本発明の趣旨に合致する限り他の実施形態も本発明の範疇に属し得ることは言うまでもない。

- 10 本発明のフィルムを構成する高分子化合物としては生分解性高分子であることが好ましい。生分解性高分子としては、ポリ乳酸、ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリエチレンアジペート、ポリブチレンアジペートなどの生分解性脂肪族ポリエステル、ポリブチレンカーボネート、ポリエチレンカーボネート等の脂肪族ポリカーボネート等が、有機溶
- 15 媒への溶解性の観点から好ましく、これらの共重合体や、混合体であっても構わない。中でも、ポリ乳酸、ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体、カプロラクトン、ポリ乳酸-ポリカプロラクトン共重合体が好ましい。

- 生分解性高分子以外的高分子化合物としては例えばポリスチレンやポリビニルアルコール、ポリ(エチレン-コビニルアセテート)、ポリ(ヒドロキシエチル
- 20 メタクリレート)、などのビニル系高分子類やこれらのコポリマー類、ポリ(カーボネート)、ポリ(ウレタン)、ナイロンなどの縮合系高分子類やこれらのコポリマー類などが挙げられる。

- 本発明のフィルムを構成するリン脂質としては、動物組織から抽出したものでも、また人工的に合成して製造したものでもその起源を問うことなく使用でき
- 25 る。リン脂質としてはホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロールおよびそれらの誘導体からなる群から選択されてなる少なくとも一種であることが好ましい。より好ましくはホスファチジルエタノールアミン類であり、さらに好ましくはL- $\alpha$ -ホスフ

ァチジルエタノールアミンージオレオイルである。

リン脂質を使用することによって、ハニカム構造を有するフィルムの接触角をリン脂質の濃度によってコントロールすることが可能となり、細胞の接着にとってより好ましい接触角のハニカム構造を有するフィルムを好ましく作製することができる。

高分子化合物とリン脂質の組成比が重量比で1 : 1 ~ 1 0 0 0 : 1 であることが好ましい。より好ましくは1 0 : 1 ~ 5 0 0 : 1 であり、さらに好ましくは5 0 : 1 ~ 2 0 0 : 1 である。

またフィルムには本発明の目的を損なわない範囲で、例えば柔軟剤や薬剤などの他の成分を含んでいても良い。

本発明のハニカム構造を有するフィルムを作製するに当たってはポリマー溶液上に微小な水滴粒子を形成させることが必須である事から、使用する有機溶剤としては非水溶性である事が必要である。これらの例としてはクロロホルム、塩化メチレン等のハロゲン系有機溶剤、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素、酢酸エチル、酢酸ブチル等のエステル類、メチルイソブチルケトン、などの非水溶性ケトン類、二硫化炭素などが挙げられる。これらの有機溶媒は単独で使用しても、又、これらの溶媒を組み合わせた混合溶媒として使用してもかまわない。

これらに溶解する高分子化合物とリン脂質両者併せての溶液濃度は0. 0 1 から1 0 wt%、より好ましくは0. 0 5 から5 wt%である。ポリマー濃度が0. 0 1 wt%より低いと得られるフィルムの力学強度が不足し望ましくない。又、1 0 wt%以上では溶液濃度が高くなりすぎ、十分なハニカム構造が得られないことがある。又、高分子化合物とリン脂質の組成比は重量比で1 : 1 から1 0 0 0 : 1 であることが好ましい。より好ましくは1 0 : 1 ~ 5 0 0 : 1 であり、さらに好ましくは5 0 : 1 ~ 2 0 0 : 1 である。リン脂質が高分子化合物に対して1 0 0 0 分の1 以下では均一なハニカム構造が得られないことがある。又、該重量比が1 : 1 以上ではフィルムとしての自己支持性を有さないことがあり、コストも高く、経済性に乏しいため好ましくない。

本発明においては該ポリマー有機溶媒溶液を基板上にキャストしハニカム構造を有するフィルムを調製するが、該基板としてはガラス、金属、シリコンウェハー等の無機材料、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエーテルケトン等の耐有機溶剤性に優れた高分子、水、流動パラフィン、液状ポリエーテル等の液体が使用できる。中でも、基材に水を使用した場合、該ハニカム構造体の特徴である自立性を生かすことで、該構造体を単独で容易に基板から取り出すことが出来、好適である。

本発明で、ハニカム構造が形成される機構は次のように考えられる。疎水性有機溶媒が蒸発するとき、潜熱を奪う為に、キャストフィルム表面の温度が下がり、微小な水の液滴がポリマー溶液表面に凝集、付着する。ポリマー溶液中の親水性部分の働きによって水と疎水性有機溶媒の間の表面張力が減少し、このため、水微粒子は凝集して 1 つの塊になろうとし、安定化する。溶媒が蒸発するに伴い、ヘキサゴナルの形をした液滴が最密充填した形で並び、最後に、水が飛び、ポリマーが規則正しくハニカム状に並んだ形として残る。従って、該フィルムを調製する環境としては相対湿度が 10 から 95 % の範囲にあることが望ましい。10 % 以下ではキャストフィルム上への結露が不十分になり、また、95 % 以上では環境のコントロールが難しく好ましくない。このようにしてできるハニカム構造体中個々のハニカムの空隙内径は 0.1 から 100  $\mu\text{m}$  である。細胞培養に適した空隙内径としては 0.1 から 20  $\mu\text{m}$  であり、より好ましくは 1  $\mu\text{m}$  から 15  $\mu\text{m}$  である。このようにして作製したハニカム構造を有するフィルムは、表面がハニカム構造を有し、膜厚が充分厚い場合は、基盤に接していた裏面は孔が貫通していない平らな面となる。また、膜厚が水滴の大きさよりも薄い場合は孔が貫通したフィルムが得られる。使用目的により、貫通または非貫通膜を選択することが望ましい。

本発明の組織再生用基材は軟骨組織の再生にとくに適した基材である。以下、軟骨細胞を例に、ハニカム構造を有するフィルム上での細胞培養方法、および組織再生用複合体の製造方法を開示する。

ハニカム構造を有するフィルム上で培養される軟骨細胞には、硝子軟骨、線

- 維性軟骨、弾性軟骨から得たものを使用する。好ましくは、移植後の修復を理想的に行うためには、非荷重部の軟骨から採取された関節軟骨細胞を用いることである。細胞は、組織から採取された後、常法に従って結合組織などを除去して調製される。または、常法を用いた一次培養によって、予め増殖させた細胞を用い
- 5   てもよい。

本発明のハニカム構造を有するフィルムに軟骨細胞を播種するに際し、シャーレ上にハニカム構造を有するフィルム作製しそのまま用いてもよいし、細胞培養容器にハニカム構造を有するフィルムを挿んでもよく、適宜使用しやすい方法を採用することができる。

- 10   ハニカム構造を有するフィルムに細胞を播種した後、さらに、培養液を添加し、適切な培地で、例えば 37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベータ内において培養増殖させることができる。

- 本発明においてハニカム構造を有するフィルムを使用する利点は、表面がハニカム構造になっているため、細胞接着面が平滑なフィルムに比べて少なく、細胞
- 15   は増殖を抑制し、基質を産出し、三次元構造の足場と同様の様子を示すことができることである。よって、ハニカム構造を有するフィルムを使用することで増殖を繰り返すことによる細胞の形態の変化を防止することができ、たとえば、軟骨細胞の場合、軟骨基質の産生が乏しい繊維性軟骨細胞が軟骨組織再生用の複合体中に高い割合で混在することを防止することができる。このため、軟骨細胞によ
- 20   る軟骨組織の再建をより効率よく行うことができる。

- また、非貫通のハニカム構造を有するフィルムを使用することで、播種用細胞液がフィルム上からもれず、結果として三次元構造スポンジなどに比べて保持される細胞の密度が高まり、組織の再生が速やかにかつ効率的に行われることになる。細胞が担持された複合体をフィルム状のままで用いると、薄い組織を再生す
- 25   ることが可能であるが、図 1 に示すように、これら細胞が担持された複合体を積層して用いることもできる。この場合において再生される組織の厚みはハニカム構造を有するフィルムの積層する枚数により調整することができる。各ハニカム構造を有するフィルム上にそれぞれ細胞の播種が行われているので、積層された

ハニカム構造を有するフィルム中の細胞の密度は、1枚のフィルムによる複合体と変わらず、これを生体内に移植すれば、組織の再生が良好に行うことができる。また、組織の再生箇所によっては、細胞の密度が異なるものを積層することも可能である。また、ハニカム構造を有するフィルムに担持された細胞の種類を変えて、積層し、生体内類似構造とすることも可能である。

また、図2に示すように、細胞で覆われたハニカム構造を有するフィルムをロール状に巻いて、円筒状の形状にすることもできる。この場合においては、再生される組織の大きさは、ロールの高さとロールを巻く回数で調整できる。

本発明において、ハニカム構造を有するフィルム上で培養するための細胞の播種密度は、細胞の種類によって異なるが、たとえば軟骨細胞の場合、細胞の増殖よりも軟骨基質の産生を優先的に行う播種密度が好ましい。このような細胞播種密度にすることによって、培養の開始時から軟骨細胞は軟骨基質の産生を旺盛に行うので、軟骨再生時に必要な量の軟骨基質を効率よく得ることができる。

たとえば、本発明において軟骨細胞の播種密度は、細胞の形態を維持して軟骨基質の産生をより効率よく行わせる観点から、例えば $400\text{ mm}^2$ の面積に細胞を播種する場合 $5 \times 10^4$ 個/ml $\sim 1 \times 10^6$ 個/mlの範囲、好ましくは、 $1 \times 10^5$ 個/ml $\sim 8 \times 10^5$ 個/mlの範囲とすることができる。

この範囲よりも細胞播種密度が低いと、軟骨細胞の増殖の方が軟骨基質の産生よりも優先的に行われ、細胞の形態が変化したり、効率よく十分な量の軟骨基質を産生しない場合がある。また、この範囲よりも細胞播種密度が高いと、軟骨細胞の細胞活性が十分に維持できず、軟骨基質の産生も不十分となる場合がある。

細胞培養期間は1日間から4週間の範囲とすることができる。好ましくは3日から3週間の範囲とすることができるが、細胞の播種量によって培養期間を調整することができ、この範囲に限定されるものではない。

軟骨基質は、通常の軟骨細胞が生体内又は培養条件下で産生する物質及び培養条件下で産生される物質のいずれかである。このような物質には、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、ケラタン硫酸などのグリコサミノグリカン（GAG）や、タイプIIコラーゲンなどが挙げられる。軟骨基質の量は、たとえばGAGの定



量により測定することができる。

このように、本発明による組織再生用の移植体は、移植時に多くの細胞と豊富な基質を含有しているため、生体との親和性も非常に高く、効率よく組織の修復を行うことができる。

- 5     たとえば、本発明で得られる軟骨細胞を培養した組織再生用基材および軟骨細胞との複合体を、移植体として使用することができる適応症としては、軟骨損傷、離断性骨軟骨炎、変形性関節症、関節リウマチなどが挙げられるが、その範囲に限定されるものではなく、軟骨欠損に起因する疾患全般に適用可能である。このように、再生したい組織に適した細胞を、組織再生用基材上で培養し複合体を得
- 10    ることで、組織再生に利用することが可能である。

### 実施例

以下、実施例に基づき、本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

15

#### 実施例 1

- ポリ乳酸(島津製作所：商品名「Lacty9031」重量平均分子量168,000)のクロロホルム溶液(5 g/L)に界面活性剤としてホスファチジルエタノールアミンージオレオイル(和光純薬)を200:1の割合で混合し、ガラス基板上にキャストし室温、湿度70%の条件下に静置し、溶媒を徐々に飛ばすことでハニカム構造を有するフィルムを調製した。電子顕微鏡写真を図3に示すが、平均空隙内径約5  $\mu$ mのハニカムフィルムが得られた。
- 20

#### 実施例 2

- 25    実施例1で作製したハニカム構造を有するフィルムを70%エタノールで滅菌し、滅菌済みの細胞培養器内(直径15mm)にフィルムを挿んだ。このフィルム上にマウス胎児繊維芽細胞(NIH3T3細胞)(ATCC製)  $3.6 \times 10^4$  個/mlを0.5ml播種し、D-MEM血清培地で37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベータ内

で培養した。24時間後および48時間後に細胞の代謝活性をアラマーブルー法により波長530nmの励起光を用いて出現した蛍光590nmを検出し測定した。その結果を図4に示す。(図4中、pはP値(probability value)を表す)

#### 5 比較例 1

ポリ乳酸のクロロホルム溶液(5 g/L)に界面活性剤として特開2001-157574号公報に記載されている方法をもとに調製したポリアクリルアミド共重合体(重量平均分子量85,000)を10:1の割合で混合し、ガラス基板上にキャストし室温、湿度70%の条件下に静置、溶媒を徐々に飛ばすことでハニカム構造を有するフィルムを調製した。得られたフィルムの光学顕微鏡写真を図5に示すが、平均空隙内径約5  $\mu$ mのハニカムフィルムが得られた。

#### 比較例 2

比較例1で作製したフィルムを用いて、実施例2と同様の試験を行った。その結果を図4に示す。

図4に示すとおり、実施例1のポリ乳酸とリン脂質より構成されるフィルムからなる組織再生用基材は、比較例1のポリ乳酸と両親媒性ポリマーより構成されるフィルムからなる組織再生用基材よりもより高い代謝活性を示すことがわかった。

20

#### 実施例 3

実施例1で作製したハニカム構造を有するフィルムを70%エタノールで滅菌し、滅菌済みの細胞培養器内にフィルムを挿んだ。一方、ウサギ膝関節の軟骨から薄い軟骨片をメスで剃りおろし、細かく刻んだ後、0.15 (w/v) %のトリプシンを含有するPBS (-) 中で1時間酵素処理し、さらに0.15 (w/v) %のコラーゲナーゼを含有するPBS (-) 中にて37℃で2時間30分インキュベートした。そして、ポアサイズが70  $\mu$ mのナイロンフィルターで濾過した濾液を1500 rpmで3分間遠心し、抗生物質と10%ウシ胎児血清を含

- 有する $\alpha$ -MEM血清培地で2回洗浄した後、ウサギ膝軟骨細胞を得た。得られた軟骨細胞を $\alpha$ -MEM血清培地で37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベータ内で培養した。2回継代培養した軟骨細胞を0.25%トリプシン/1mmol EDTA/PBS (－) で剥離・採集し、 $2 \times 10^5$  cells/ml細胞液を調製した。
- 5 した。ハニカム構造を有するフィルムを1mlの培地で濡らしてから、上記の細胞液を1ml播種する。次いで6ウェルプレート内に収め、5%CO<sub>2</sub>、37℃インキュベーター内で培養をする。次の日培地をすべて吸引し25 $\mu$ g/mlのAscorbic Acid入りの培地で細胞培養容器内に2ml加えた培地交換を行い、その後、2日おきに培地交換を行い、3週間まで静置して培養した。
- 10 日後および10日後に細胞の代謝活性をアラマーブルー法により測定した。その結果を表1に示す。培養後、容器から移植体を外し、Biocolor社(UK)のBlyscan™キットを用いてGAG測定を行った。その結果を表2に示す。

また得られた軟骨細胞と軟骨組織再生用基材との複合体の光学顕微鏡写真を図6に示す。

15

### 比較例3

比較例1で作製したフィルムを用いて、実施例3と同様の培養を行った。3日後および10日後に細胞の代謝活性をアラマーブルー法により測定した。その結果を表1に示す。

20

表1 蛍光強度

|      | 3日後   | 10日後    |
|------|-------|---------|
| 実施例3 | 40549 | 1763476 |
| 比較例3 | 31221 | 1320767 |

- 代謝活性試験より、実施例1のポリ乳酸とリン脂質より構成されるフィルムからなる組織再生用基材は、比較例1のポリ乳酸と両親媒性ポリマーより構成される
- 25 フィルムからなる組織再生用基材よりもより高い代謝活性を示すことがわかった。

## 比較例 4

実施例 3 と同様の大きさのシャーレ上で同様に軟骨細胞を培養し（単層培養）、3 週間培養後 GAG 測定を行った。その結果を表 2 に示す。

## 5 比較例 5

- 実施例 3 と同様にウサギ軟骨細胞を取り出し、得られた軟骨細胞を培養液と混合して軟骨細胞浮遊液を作製し、この軟骨細胞浮遊液と同量のコラーゲン（アテロコラーゲン：高研研）内に  $2 \times 10^5$  cells/ml の密度になるように包埋した後、培養を開始した。このときコラーゲンの最終濃度は 2.4 重量%となった。
- 10 次いで 6 ウェルプレート内に収め、5 % CO<sub>2</sub>、37℃インキュベーター内で  $25 \mu\text{g/ml}$  の Ascorbic Acid 入りの培地を用い培養をし、3 週間培養後 GAG 測定を行った。その結果を表 2 に示す。

表 2 細胞あたりの GAG 合成量

|                       | GAG contents ( $\mu\text{g}/\mu\text{gDNA}$ ) |
|-----------------------|---|
| 実施例 3（ハニカム構造を有するフィルム） | 102   |
| 比較例 4（単層培養）           | 49  |
| 比較例 5（アテロコラーゲンゲル）     | 28  |

15

表 2 に示したとおり、ハニカム構造を有するフィルム上では単層培養に比べ、2 倍以上、またアテロコラーゲンゲル培養に比べて 4 倍近い GAG 合成が認められた。上記で述べたように GAG 量は軟骨の基質量を反映しており、実施例 3 においてはより、軟骨基質を産生していることを示している。

20

## 比較例 6

ポリ乳酸のクロロホルム溶液 (5 g/L) に界面活性剤として L- $\alpha$ -ホスファチジルエタノールアミン-ジオレオイルを 200:1 の割合で混合し、ガラス基板上にキャストし室温条件下に静置、溶媒を徐々に飛ばすことでキャストフィル

ムを調製した。

#### 比較例 7

- 比較例 7 で得られたキャストフィルム上に、実施例 3 と同じ条件で軟骨細胞を  
5 培養した。得られた軟骨細胞とキャストフィルムの複合体の光学顕微鏡写真を図  
7 に示す。

- 図 6 および図 7 から本発明のハニカム構造を有するフィルムからなる組織再  
生用基材では軟骨細胞が三次元的に増殖し、かつ細胞の形態に変化が無いこ と、  
10 すなわち繊維性の軟骨が少ないのに対し、単なるキャストフィルムからなる組織  
再生用基材では細胞外基質の産生に乏しく、細胞は扁平化している、すなわち繊維  
性の軟骨であることがわかる。

## 請求の範囲

1. 高分子化合物とリン脂質を主たる成分とするハニカム構造を有するフィルムからなる組織再生用基材。
- 5 2. 該高分子化合物が生分解性高分子であることを特徴とする請求項 1 に記載の組織再生用基材。
3. 該リン脂質がホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロールおよびそれらの誘導体からなる群から選択される少なくとも一種である請求項 2 に記載の組織再生用基材。
- 10 4. 該リン脂質がホスファチジルエタノールアミンである請求項 3 に記載の組織再生用基材。
- 15 5. 該リン脂質が L- $\alpha$ -ホスファチジルエタノールアミン-ジオレオイルである請求項 4 に記載の組織再生用基材。
6. 高分子化合物とリン脂質の組成比が重量比で 10 : 1 ~ 500 : 1 であることを特徴とする請求項 1 に記載の組織再生用基材。
- 20 7. 該ハニカム構造の平均空隙内径が 0.1 から 20  $\mu$ m であることを特徴とする請求項 1 に記載の組織再生用基材。
- 25 8. 組織が軟骨組織であることを特徴とする請求項 1 に記載の組織再生用基材。
9. 請求項 1 に記載された組織再生用基材と該組織再生用基材に担持された細胞からなる組織再生用複合体。

10. 組織が軟骨組織であることを特徴とする請求項9に記載の組織再生用複合体。

11. 請求項1に記載された組織再生用基材上で細胞を培養し、組織再生用基材  
5 上に細胞が担持された組織再生用複合体を製造する方法。

1/3

図 1

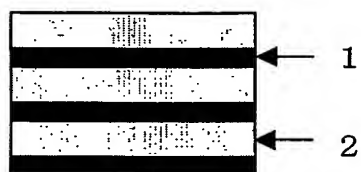


図 2

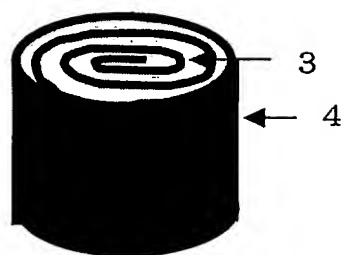


図 3

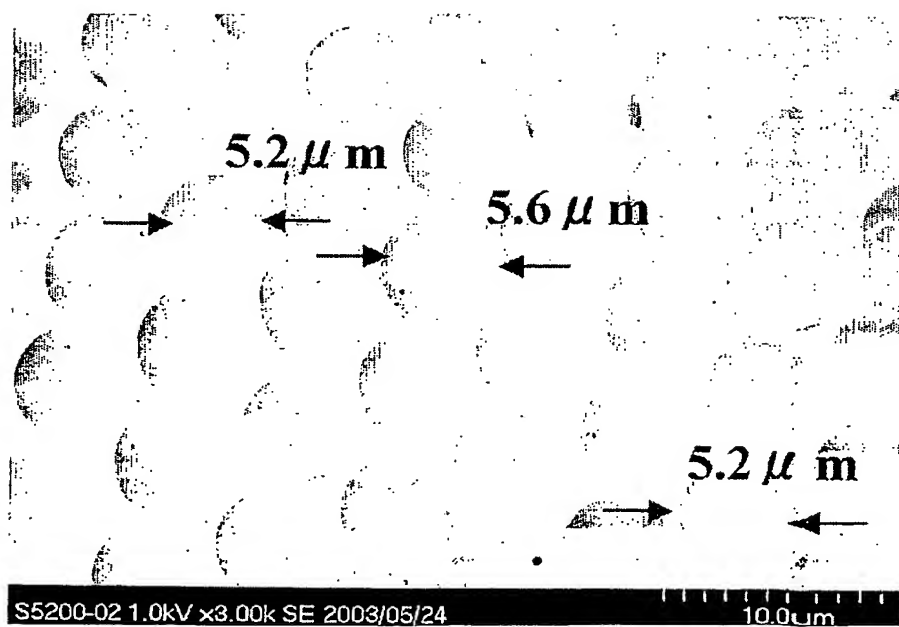




図 4

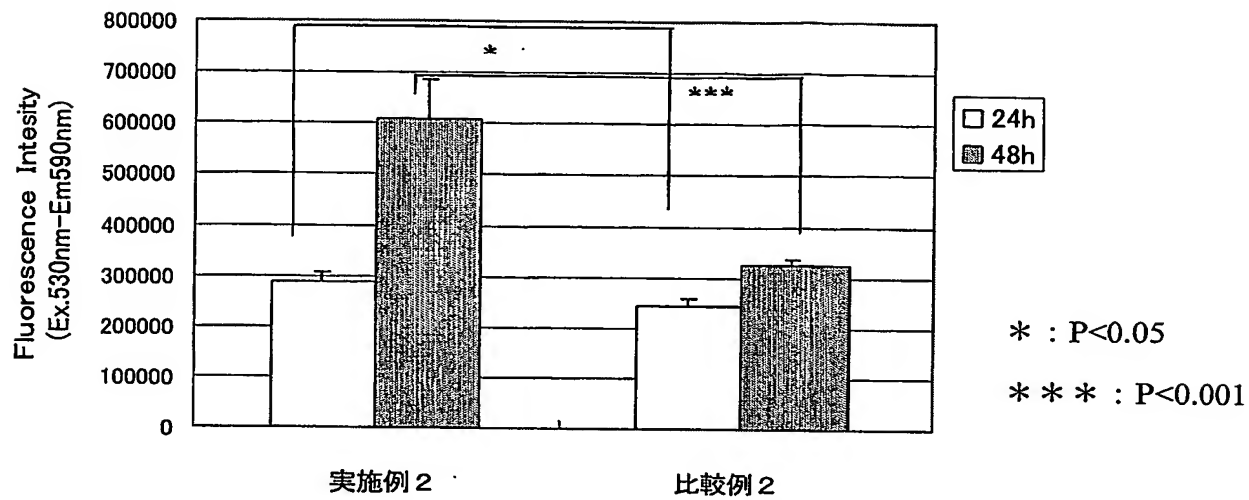
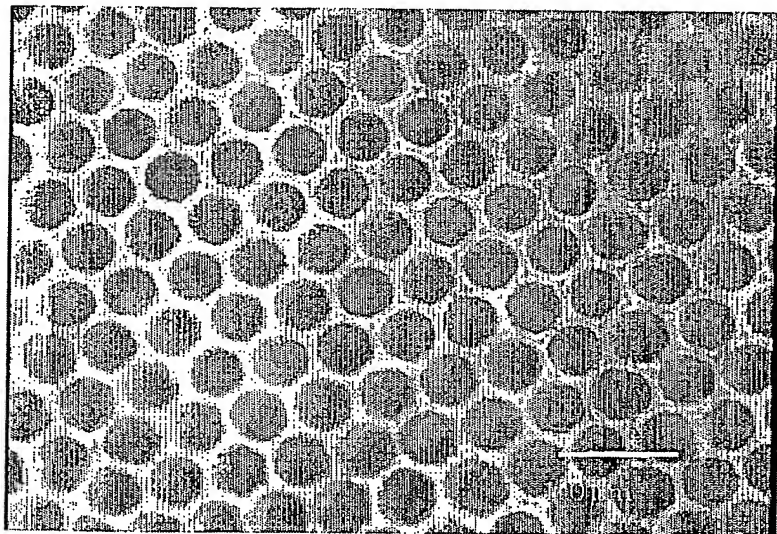


図 5



3/3

図 6

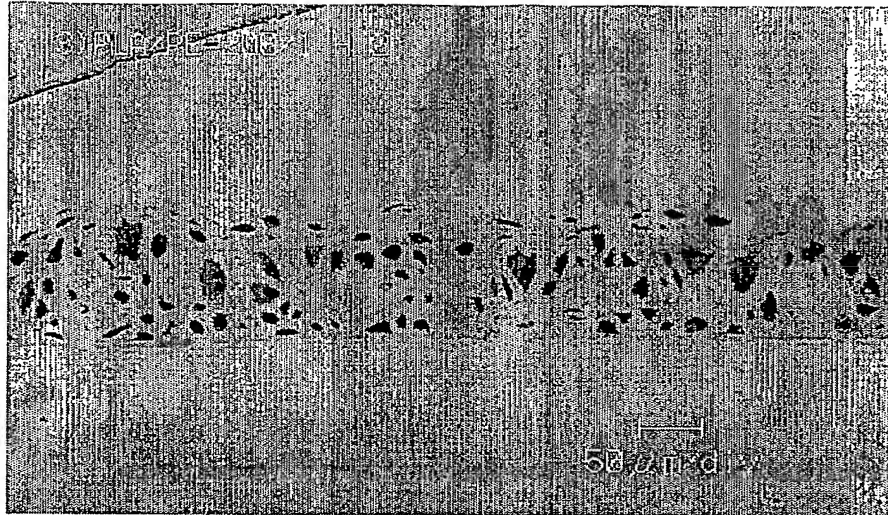
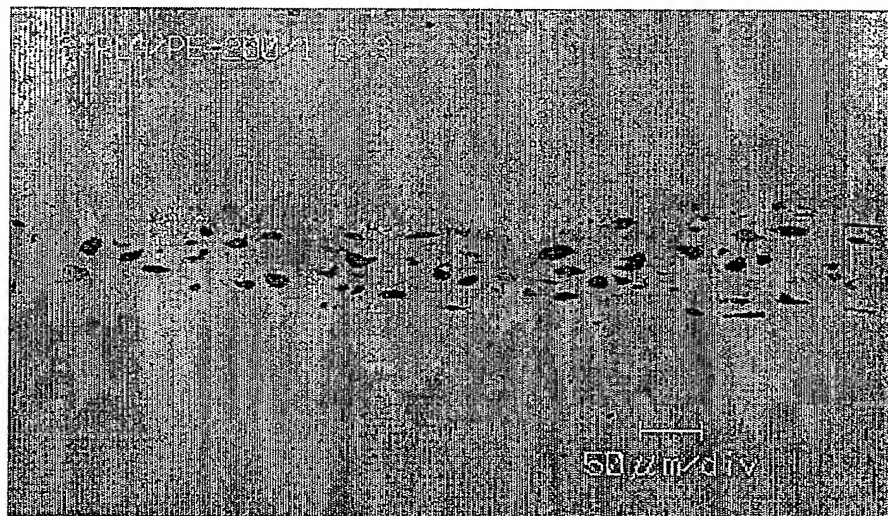


図 7



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017637

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61L27/56, 27/44, 27/38

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61L27/56, 27/44, 27/38

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1926-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2005 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2005 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2005 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y<br>A    | WATANABE, J. et al., Stereocomplex Formation by Enantiomeric Poly(lactic acid) Graft-Type Phospholipid Polymers for Tissue Engineering, Biomacromolecules, 2002, Vol.3, No.5, pages 1109 to 1114, abstract | 1, 2, 6-11<br>3-5     |
| Y<br>A    | JP 2002-345455 A (Seikagaku Corp.), 03 December, 2002 (03.12.02), Claim 1; Par. No. [0038] (Family: none)  | 1, 2, 6-11<br>3-5     |
| A         | JP 07-135961 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 30 May, 1995 (30.05.95), Claim 1 (Family: none)  | 1-11                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 January, 2005 (07.01.05)

Date of mailing of the international search report  
25 January, 2005 (25.01.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/017637

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages             | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| P, A      | WO 04/89434 A1 (Teijin Ltd.) ,<br>21 October, 2004 (21.10.04) ,<br>Full text<br>(Family: none) | 1-11                  |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61L27/56, 27/44, 27/38

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61L27/56, 27/44, 27/38

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |            |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報   | 1926-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2005年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2005年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2005年 |

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリ* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号  |
|----------------|---|-------------------|
| Y<br>A         | WATANABE, J. et al, Stereocomplex Formation by Enantiomeric Poly(lactic acid) Graft-Type Phospholipid Polymers for Tissue Engineering, Biomacromolecules, 2002, Vol.3, No.5, p.1109-1114, Abstract等参照 | 1, 2, 6-11<br>3-5 |
| Y<br>A         | JP 2002-345455 A (生化学工業株式会社) 2002.12.03, 請求項1、【0038】段落参照 (ファミリーなし)  | 1, 2, 6-11<br>3-5 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリ

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.01.2005

国際調査報告の発送日

25.1.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

安川 聡

4C

3039

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |   |                  |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                               | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | JP 07-135961 A (住友ベークライト株式会社) 1995. 05. 30,<br>請求項1参照 (ファミリーなし) | 1-11             |
| P, A                  | WO 04/89434 A1 (帝人株式会社) 2004. 10. 21,<br>全文 (ファミリーなし)           | 1-11             |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**